

ПОЛУЧЕНИЕ МИКРОЧАСТИЦ ФУКОИДАНОВ

Супрунчук В.Е.

научный руководитель канд. биол. наук Денисова Е. В.

Северо-Кавказский Федеральный Университет

Интерес к исследованию микрочастиц обусловлен широкой областью их как научного, так и практического применения. Известно более десятка типов таких частиц, причем в состав некоторых из них могут входить только природные полиионы (например, липосомы), либо только синтетические полимеры (полимерные мицеллы, полимерные наносферы), либо же и те и другие, для стабилизации большинства которых, используются ПАВ и эмульгаторы.

Наиболее применяемыми для этих целей органическими полимерами являются белки (желатин, альбумин), полисахариды (гуммиарабик), воска, парафин, поливиниловый спирт, поливинилхлорид, полиакриламид, полисилоксаны. Выбор материала оболочек и последующее строение микрочастиц зависит от их назначения. Следует отметить, что синтетические микрочастицы являются гидрофобными, механически жесткими (не способными к набуханию в водной фазе) и не биodeградируемыми, в то время как основанные на природных полимерах - относительно гидрофильны, способны к био- и гидролитической деградации, а так же к набуханию в водной среде. Поэтому в некоторых случаях при рассмотрении данной проблематики акцент ставится на полимеры природного происхождения. Из природных же полимеров широко распространенными и постоянно воспроизводимыми в природе являются полисахариды. Они являются доступной альтернативой синтетическим полимерам, т.к. обладают многими свойствами характерными для полимерных матриц, а именно, как правило, не токсичны, не вызывают аллергических реакций, не накапливаются в организме и обладают реакционно-способными функциональными группами, легко вступающие в химические реакции.

Из большого разнообразия полисахаридов для исследования нами были выбраны фукоиданы, благодаря широкому спектру их физиологической активности. Согласно литературным данным, фукоиданы обладают антикоагулянтной [2], антитромбической [10], противовирусной [9] и др. активностями. При этом биологическая активность фукоиданов возрастает с увеличением молекулярной массы и содержания сульфатных групп. Фукоиданы - семейство высокосульфатированных, водорастворимых, обычно разветвленных гомо- и гетерополисахаридов, где основным моносахаридным остатком выступает L-фукоза [6]. Между собой могут отличаться по типу связей α -фукозы, структурным сахарам, содержанию сульфатных групп и моносахаридному составу [5]. Получают их из бурых водорослей и некоторых иглокожих.

В общем случае структуру можно представить следующим образом:

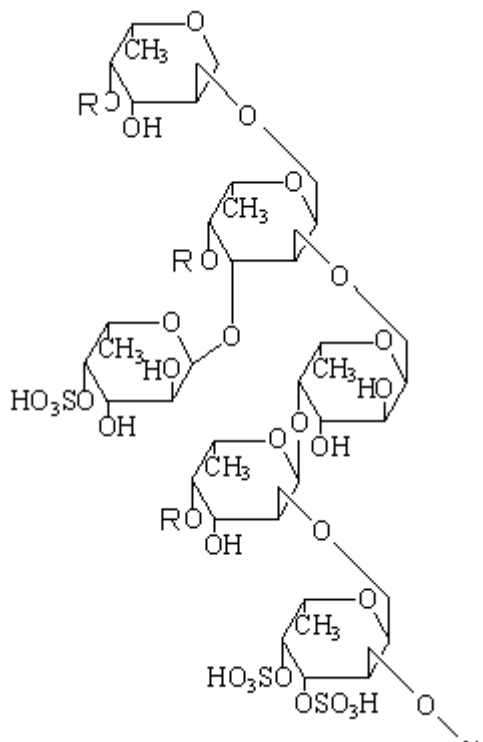


Рис.1.Примерная структура фукоидана,
где R = H, SO_3^- , Ac; Fuc, GlcA, Man, Xyl, Gal

В ходе работы нами были отобраны и оптимизированы известные методики [11] получения микрочастиц с учетом специфики фукоиданов и их производных. В процессе получения микрочастиц варьировалась концентрация полисахаридного компонента, эмульгатора, стабилизатора. Исследовалось влияние природы и концентрации действующего вещества на образование, размеры и стабильность наносистем.

Материалы и методы исследования

С учетом анализа литературы, нами был выбран способ позволяющий получить набор индивидуальных полисахаридов со стандартными характеристиками. Данный разработан Шевченко Н.М. и является запатентованной технологией [3].

Полученный препарат фукоиданов имел бурую окраску вследствие присутствия полифенольных соединений. Для обесцвечивания природных полисахаридов используют перекись водорода [1], при этом нами была подобрана методика при применении которой сохраняется структура полисахарида, рассмотренная в работе [4].

Обработанный полисахарид хроматографировали на колонке (3×15 см) с DEAE-целлюлозой линейным градиентом 0...2 М вода / NaCl (500 мл / 500 мл) со скоростью 1,1 мл/мин. Наличие полисахарида в полученных пробах определяли методом, основанным на реакции взаимодействия полисахарида с резорцином в кислой среде и последующем фотометрическом измерении продукта реакции окрашенного в красно-оранжевый цвет, при длине волны 480 нм на фотоэлектроколориметре «КФК – 2».

Пробы, в которых присутствовал полисахарид, вновь осаждали спиртом, отфильтровывали и высушивали. Полученный таким образом полисахарид представлял собой порошок светло-бежевого цвета.

Так же для установления состава полученного полисахарида был проведен кислотный гидролиз с последующей ТСХ. Кислотный гидролиз полученного полисахарида

проводили в 2н. HCl, при 60 °С в течение 6-ти часов, в круглодонной колбе, снабженной холодильником. Идентификация препарата проводили методом тонкослойной хроматографии на пластинах «Silufol» [7]. Состав разделяющей смеси: н-бутанол-уксусная кислота-вода (60 мл - 15 мл - 25 мл). Используемый проявляющий реагент: н-бутанол-вода-уксусная кислота - фосфорная кислота-дифениламин (60 мл - 25 мл – 10 мл – 1 мл – 2 г). По окончании хроматографирования пластину сушили при температуре 120 °С. В результате проведенного кислотного гидролиза и последующей ТСХ было установлено, что в состав полученного полисахарида входят остатки фукозы, ксилоза, моноза, галактоза и глюкоза.

Общий принцип получения микросфер, формируемых из водорастворимых (гидрофильных) и жирорастворимых (гидрофобных) веществ состоит в получении эмульсий типа вода/масло или масло/вода, а также различного рода дисперсий.

Для получения микрочастиц нами была оптимизирована методика [11], позволяющая получать полиакриламидные микросферы путем полимеризации водной эмульсии акриламида и бисметакриламида в гексане.

Исследования проводили при варьировании концентрации полисахаридного компонента, эмульгаторов и стабилизаторов. В соответствии с чем было получено 8 образцов различного содержания, включающие: микросферы полученные непосредственно по методике; микросферы, в которых осуществлялось введение фукоидана в соотношении 1:1, 1:3 в отношении акриламидного раствора; микросферы с полной заменой 30% раствора акриламида/бисакриламида на раствор фукоидана, с последующим изменением концентраций эмульгаторов и стабилизаторов:

- 1 - образец, полученный по методике 1;
- 2, 7 - образцы, полученные полной заменой акриламидного раствора на водный раствор фукоидана с использованием различных эмульгаторов (во втором использовался ПЭГ - 12, в седьмом - циклометикон);
- 3, 4 - образцы, полученные заменой акриламидного раствора в соотношении 1:1 и 1:3 соответственно.

Результаты и обсуждение

Основные стадии получения микрочастиц состоят из получения фракций фукоиданов с последующей отчисткой от полифенолов, исследования влияния природы и концентрации действующего вещества на образование, размеры и стабильность наносистем.

Важным критерием для формирования ПЭК является получение стабильных во времени микрочастиц. Устойчивость определялось путем подсчета количества частиц с помощью камеры Гаряева. Измерения проводили в течение трех месяцев (рис.6).

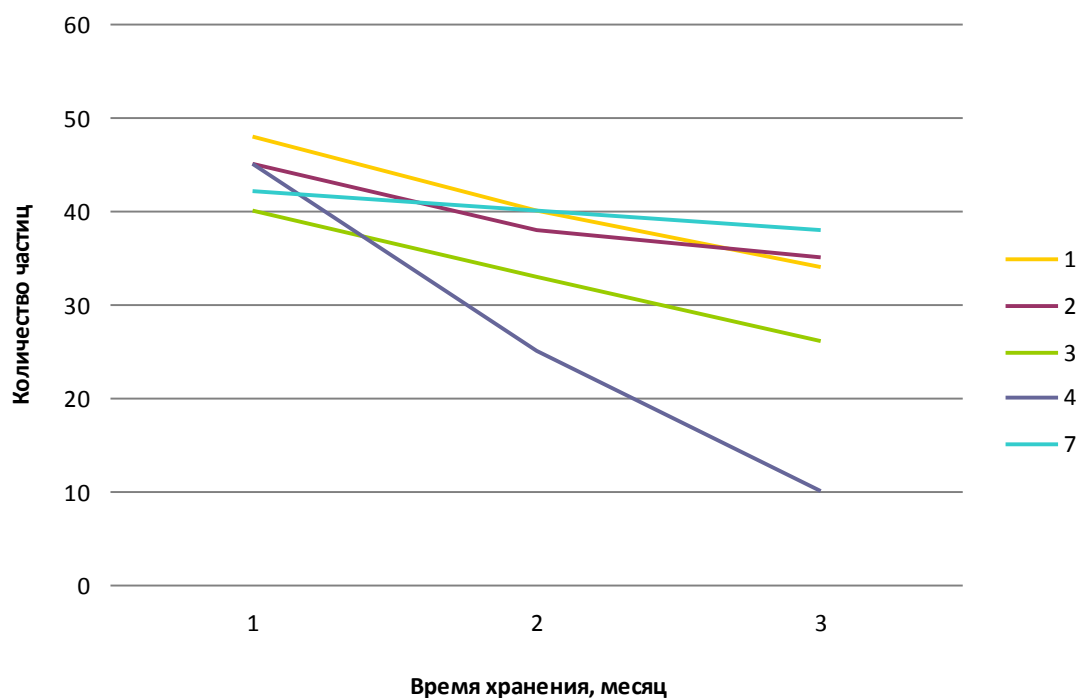


Рис.2. Стабильность полученных ПЭК

Из рис 2. видно, что микрочастицы полученные с использованием полиакриламида и фукоидана в отдельности обладают приблизительно одинаковой устойчивостью во времени. Однако при совместном использовании данных полиэлектролитов в различных соотношениях (1:1 и 1:3), стабильность частиц уменьшается, что может свидетельствовать об отсутствии взаимодействий между полимерами.

При рассмотрении образцов 2 и 7 можно сделать вывод, что природа эмульгатора существенного влияния на устойчивость во времени не оказывает.

Так же установлено что в образцах 3 и 4 произошло частичное капсулирование фукоидана и его абсорбция на поверхности частиц, а в - 2,7 осуществилось включение непосредственно в стенку микрочастиц.

Наличие реакционноспособных функциональных групп в полисахаридах, а так же использование эмульгатора на полидиметилсилоксановой основе позволяет создавать устойчивые микросферы которые могут служить для инкапсуляции различного рода веществ.

Полученные в работе образцы ПЭК фотографировали с помощью фотонасадки в DCM 300 одинаковых условиях (объем нанесения на предметное стекло, увеличение x120). Для определения локализации полисахарида ПЭК были окрашены 0,02 М раствором AgNO_3 .

Так же следует отметить, Из которых установлено, что природа эмульгатора существенного влияния на размеры частиц не оказывает. Изменение концентрации фукоидана приводит к изменению размеров частиц, так с помощью камеры Горяева было установлено, что с увеличением концентрации фукоидана в системе происходит уменьшение размера частиц. Все остальные микрочастицы, полученные при постоянной концентрации полисахарида имеют схожие размеры.

Проведенное исследование показало, что наличие реакционноспособных функциональных групп в полисахаридах и полисахаридальдегидах, а так же использование эмульгатора на полидиметилсилоксановой основе позволяет создавать устойчивые микрочастицы.

Литература

1. Колмакова, О.А., Пен, Р.З., Шапиро, И.Л., Бывшев, А.В., Тарабанько, В.Е. Низкотемпературная окислительная делигнификация древесины. Химические свойства пероксидной целлюлозы // Химия растительного сырья. – 2003. – №1. – С. 39–43.
2. Кузнецова, Т. А., Беседнова, Н. Н., Мамаев, А. Н. и др. Антикоагулянтная активность фукоидана из бурой водоросли Охотского моря *Fucus evanescens* // Бюл. exper. биол. – 2003. – т. 136. – №11. – С. 532-534.
3. Патент РФ 2240816. Способ комплексной переработки бурых водорослей с получением препаратов для медицины и косметологии.
4. Урванцева, А.М., Бакунина И.Ю., Ким Н.Ю., Исаков В.В., Глазунов В.П., Звягинцева Т.Н. Выделение очищенного фукоидана из природного комплекса с полифенолами и его характеристика // Химия растительного сырья. – 2004. – №3. – С. 15–24.
5. Шевченко, Н. М. Строение, биологическая активность полисахаридов некоторых бурых водорослей и продуктов их ферментативной трансформации / дис. канд. хим. наук. — Владивосток, 2001. – 91 с.
6. Berteau O., Mullou B. Sulfated fucans, fresh perspectives: structures, functions and biological properties of sulfated fucans and an overview of enzymes active toward this class of polysaccharide// Glycobiology. – 2003. – Vol. 13, №6. – P. 29-40
7. Bush, A., Martin-Pastor, M. Structure and conformation of complex carbohydrates of glycoproteins, glycolipids, and bacterial polysaccharides C // Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct., 1999 – V.28. – P.269-293.
8. Cumashi, A., Ushakova, N. A., Preobrazhenskaya, M. E. et al. A comparative study of the anti-inflammatory, anticoagulant, antiangiogenic, and antiadhesive activities of nine different fucoidans from brown seaweeds // Glycobiology, 2007. – Vol.17, №5. – P. 541-552.
9. Mandal, P., Mateu, C. G., Chattopadhyay, K. et al. Structural features and antiviral activity of sulphated fucans from the brown seaweed *Cystoseira indica* // Antiviral Chemistry and Chemotherapy. – 2007. – Vol. 18, №3. – P. 153-162.
10. Nishino, T., Fukuda, A., Nagumo, T. et al. Inhibition of the generation of thrombin and factor Xa by a fucoidan from the brown seaweed *Ecklonia kurome* // Thromb. Res., 1999. – Vol. 96. – P. 37-49.
11. United States Patent 6,235,313. Bioadhesive microspheres and their use as drug delivery and imaging systems.